



Title	Identifying bioactive properties of graphene oxide scaffold for bone tissue engineering therapy [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	西田, 絵利香
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12155号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62172
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Erika_Nishida_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 西田絵利香

学位論文題名

Identifying bioactive properties of graphene oxide scaffold for bone tissue engineering therapy
(骨組織再生用酸化グラフェンスキャフォールドの生体活性評価)

【目的】

再生療法は炎症などの破壊的な病気によって失われた組織の再生を目的とする治療法で、細胞、増殖因子、足場材（スキャフォールド）の3要素が必要と考えられている。なかでもスキャフォールドは細胞の内部増殖（イングロース）や再生スペースを確保し、良好な生体活性を有することが求められている。近年、バイオマテリアル表面へのナノストラクチャー付与により、比表面積が拡大し、付着した細胞の様々な活性が向上することが報告されている。ナノカーボン材料である酸化グラフェン（GO）は、厚さ1ナノメートル以下の単層カーボンシートで、ユニークな理工学的特性を有するとともに、タンパク質吸着性、ドラッグデリバリー効果や培養骨芽細胞の増殖効果が明らかになっている。したがってGOをスキャフォールドに利用することで、骨再生医療分野への応用が期待される。しかし、高濃度のナノ材料の使用は、生体へ悪影響を引き起こす可能性がある。GOスキャフォールドの強度はGOの濃度依存性に向上したが、高濃度のGOは細胞増殖やイングロースを阻害することが報告されていることから、GOの濃度設定は重要な因子である。そこで本研究では低濃度のGOを応用した組織再生用スキャフォールドを作製し、*in vitro* および *in vivo* において生物学的特性を評価し、さらにイヌ抜歯窩モデルにおける骨新生効果を検討した。

【材料と方法】

Hummers-Offeman 法により作成したGO（nanoGRAX(R)；三菱ガス化学）を、N-メチルピロリドンにて希釈し0, 0.1, 1 $\mu\text{g/mL}$ のGO分散液を作製した。GOスキャフォールドは、コラーゲンスキャフォールド（6×6×3mm, テルダーミス(R)；オリンパステルモバイオマテリアル）に各GO分散液を浸透させ、溶媒をエタノール系列にて除去洗浄後、乾燥させて作製した。特性評価として、SEM観察、圧縮強度試験、コラーゲン耐性試験、カルシウム（Ca）とタンパク質吸着試験を行った。また、MC3T3-E1細胞をスキャフォールドに播種培養し、SEM観察とWST-8にて細胞増殖量を測定した。

次に各スキャフォールドをラット結合組織内へ埋植して生体親和性試験を行った。埋植後10日目の炎症反応を観察するとともに、イングロースした細胞や組織の組織学的定量と摘出したスキャフォールド内のDNA量測定を行った。また、埋植後10, 35日目にM1, M2マクロファージ、線維芽細胞、平滑筋細胞、好中球について免疫染色を行った。

骨新生試験としてビーグル犬の前臼歯部抜歯窩に1 $\mu\text{g/mL}$ GOスキャフォールドを埋入後、2週後の骨新生についてエックス線ならびに組織学的に評価した。なお動物実験は北海道大学動物実験委員会の審査承認を受けて行った（北海道大学動物実験委員会、承認番号13-76, 8-255）。

【結果】

SEM観察の結果、GOはコラーゲンスキャフォールド表面に薄く均一に付着していた。また、気孔率はいずれのスキャフォールドでも約97%であり高気孔性を維持していた。圧縮

強度、コラゲナーゼ耐性、カルシウム吸着量、タンパク質吸着量は G0 スキャフォールドで高い値を示し、1 $\mu\text{g/mL}$ G0 スキャフォールドでコントロールのそれぞれ 1.7 倍、1.2 倍、1.2 倍、1.7 倍であった。

E1 細胞を播種培養後のスキャフォールドを SEM にて観察すると、G0 上で細胞は仮足を伸ばし、良好な細胞伸展を認めた。細胞増殖量の測定の結果、G0 スキャフォールド上における細胞増殖性は良好で、7 日目における増殖量は 1 $\mu\text{g/mL}$ G0 スキャフォールドでコントロールに比較して 1.6 倍高く、有意差を認めた。

ラット結合組織内へ埋植した結果、コントロールと 0.1 $\mu\text{g/mL}$ G0 スキャフォールドは圧縮されており、スキャフォールド辺縁部や内部への細胞のイングロースはわずかであった。一方、1 $\mu\text{g/mL}$ G0 スキャフォールドはスキャフォールドの形と内部空間を維持し、活発な巨細胞や線維芽細胞様細胞のイングロースと血管様管腔構造の形成が観察された。異物巨細胞数、組織侵入面積、DNA 量の計測の結果、1 $\mu\text{g/mL}$ G0 スキャフォールドはコントロールに比較してそれぞれ 6.2、2.5、1.4 倍であり有意に高い値を示した。

免疫染色の結果、10 日目では 1 $\mu\text{g/mL}$ G0 スキャフォールド内部に M1、M2 マクロファージ、線維芽細胞の良好なイングロースを認め、血管新生も多く観察された。一方コントロールでは M2 マクロファージは観察されず、他の細胞のイングロースも僅かであった。35 日目の結果では、1 $\mu\text{g/mL}$ G0 スキャフォールドへの細胞イングロース、血管新生は増加し、特に M2 マクロファージの顕著な増加を認めたが、コントロールでは 10 日目に比較して細胞イングロースにほとんど変化を認めなかった。ペルオキシダーゼ染色の結果、1 $\mu\text{g/mL}$ G0 スキャフォールドの辺縁部には若干の陽性細胞を観察したが、コントロールでは陽性細胞は認めなかった。

イス抜歯窩における骨新生試験の結果、組織標本において G0 スキャフォールドの埋植によって多くの骨新生を観察した。結合組織や新生骨周囲には集積した G0 が散在していた。コントロールでは抜歯窩の大部分は結合組織で満たされ、骨新生はわずかであった。G0 スキャフォールドの新生骨形成量は、コントロールの約 5 倍で有意に高い値を示した。

【考察】

本研究の結果からコラーゲンスキャフォールドへの G0 の添加が、細胞増殖やイングロースを促進させることが明らかになった。バイオマテリアル表面にナノ構造を付与すると比表面積が増大し、様々な生体活性が向上することが報告されている。本研究でも G0 付与によりスキャフォールド表面に G0 の皺を認め、ナノ構造付与による特性の向上が示唆された。また、本研究で G0 スキャフォールドはタンパク質吸着性の向上を示した。G0 は多くの官能基を有していることから、細胞接着・増殖タンパクなどの生体分子を吸着して、細胞活性を促進させることが報告されている。M1 マクロファージは炎症性マクロファージ、M2 マクロファージは組織修復性マクロファージであることが知られているが、G0 スキャフォールドを埋植した結果から M2 マクロファージの出現と増加が観察された。これらのことから、コラーゲンスキャフォールドに G0 を付与すると、細胞や血管のイングロース等の組織修復プロセスを促進させることができ、生体埋入後の自己組織化に有効であると思われる。再生療法におけるスキャフォールドには細胞が侵入、増殖できるスペースを確保し、再生空間を維持するための強度が必要とされる。G0 スキャフォールドは高気孔性を維持、圧縮強度も向上し、スペースメイキング効果を発揮したと思われる。高濃度の 10 $\mu\text{g/mL}$ G0 スキャフォールドについて検討した過去の研究では、スキャフォールドの強度が飛躍的に向上したが、逆に細胞増殖やイングロースの抑制が示された。しかし、本実験で用いた低濃度 G0 スキャフォールドは良好な生体反応を示したことから、高濃度 G0 に見られたネガティブな

反応を排除できたと思われた。

G0 スキャフォールドは高い Ca 吸着性を示した。Ca の存在は骨芽細胞の骨マーカーの発現や ALP 活性を向上させることが報告されている。本研究のイヌ抜歯窩モデルにおいて、G0 スキャフォールドを埋入することで生体活性が向上したことに加え、Ca 吸着も骨新生を促進させた可能性も考えられた。

【結論】

G0 スキャフォールドは良好な生物学的特性を有し、抜歯窩へ埋入すると骨新生を促進した。骨組織再生用スキャフォールドとしての有用性が示唆された。